

論文審査の結果の要旨

氏名：森 美里

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

論文題：高濃度アスコルビン酸投与に伴いヒラメ皮膚組織で発現上昇するヘモグロビン β 鎖の研究

審査委員：（主査）教授 小島 隆人

（副査）教授 司馬 肇

教授 糸井 史朗

准教授 間野 伸宏

本論文は、魚類の免疫賦活剤であるアスコルビン酸（以下、AsA）の高濃度投与方法をモデルとして、皮膚組織に対する知見が豊富なヒラメを供試魚に用い、免疫賦活剤が魚類の皮膚組織の生体防御能に及ぼす影響を明らかにすること目的として、試みたものである。

まず、高濃度 AsA 投与によってヒラメ皮膚粘液で上昇する生体防御因子の特定を試みた。すなわち、二次元電気泳動解析を行い、高濃度 AsA 投与魚で顕著に増加した複数のスポットを切り出して LC-MS/MS 解析を行った結果、生体防御因子として報告されている serotransferrin、transferrin、apolipoprotein A-1、warm temperature acclimation related protein 65 kDa、complement component 3、および hemoglobin beta-A chain (Hb β) に同定された。また、より網羅的に皮膚粘液を解析するため、同一条件で得たヒラメ皮膚粘液を用いて SDS-PAGE および UPLC-MS/MS 解析を実施したところ、serotransferrin、complement component 3 および Hb β の有意な発現上昇が認められた。そこで、高濃度 AsA 投与時に皮膚組織特異的に発現上昇する因子を明らかにすることを目的として、上記 6 因子についてリアルタイム PCR 解析を実施したところ、皮膚組織で発現上昇が認められたのは Hb β のみであった。Hb β の発現細胞を特定することを目的として *in situ* hybridization を実施した結果、表皮層および真皮層を構成する 4 種類の細胞で Hb β の発現を確認した。いずれの細胞も AsA 投与により発現が増加しており、特に表皮組織の基底膜に局在する上皮細胞において、AsA 投与に伴い強いシグナルが確認された。これらの結果は、ヒラメにおける高濃度 AsA 投与では皮膚組織の上皮細胞が影響を受け、Hb β を含む複数の生体防御因子が皮膚粘液中で増加することを示唆している。

Hb β は酸素運搬機能を有するヘモグロビンを構成するサブユニットの一つであり、その分解産物は多様な生理活性を有することが知られている。なかでも、抗菌活性については、哺乳類から魚類までの多様な生物種において報告されている。しかし、魚類の皮膚組織中の Hb β の機能について明らかにした知見はない。

そこで申請者は、同因子の機能推定を目的として、飼育実験を行った。すなわち、ヒラメを供試魚として、昇温ストレス、エドワジエラ症原因細菌 *Edwardsiella piscicida* による人為感染、および高濃度 AsA または ラクトフェリン (LF) を展着させた配合飼料を与える免疫賦活剤投与、の 3 系統の飼育実験を行い、経時的に魚体を取り上げ、粘膜組織 (表皮, 鰓, 腸管組織) を採取して *Hbβ* の qRT-PCR 解析を行った。その結果、魚体の生体防御能が低下する昇温時には鰓組織中の *Hbβ* の有意な発現減少が認められ、生体防御能が向上する感染初期ならびに免疫賦活剤投与時には同因子の有意な発現上昇が認められた。上記の結果から、皮膚組織から分泌される *Hbβ* は魚体の抗病性を左右する主要な生体防御因子であると推察された。

そこで、ヒラメ皮膚組織中の *Hbβ* が生体防御因子として機能しているかを明らかにすることを目的として、UPLC-MS/MS 解析で有意な発現上昇が認められた *Hbβ* 配列¹³⁵ FLAVVVSALGRQYH¹⁴⁸ を含み、他魚種で抗菌活性を示すことが報告されている¹¹⁵AAKFGPSVFTADAQEAWQKFLAVVVSALGKQYH¹⁴⁸ (*Hbβ*33) の人工合成を実施した。*Hbβ*33 を用いて、魚病細菌を含む複数のグラム陰性・陽性菌 計 8 菌に対する抗菌スペクトルの特定を行ったところ、ヒラメエドワジエラ症原因細菌である *Edwardsiella piscicida* を含む計 6 菌に対して抗菌活性を示した。つぎに、抗菌活性を示す条件を明らかにすることを目的として、塩分、pH、温度および酵素処理に対する耐性を明らかにしたところ、最も強い抗菌活性が認められたのはヒラメの適性環境に近い 150mM NaCl、pH7.0、温度 20°Cであったことから、*Hbβ* がヒラメの皮膚組織における生体防御因子として機能していると結論した。

本研究では、上記成果をとりまとめ、世界的に魚類養殖で用いられている免疫賦活剤の魚類皮膚組織の生体防御能への影響の一端を明らかにしたものである。魚類の皮膚組織は、主要な生体防御機構でありながら、免疫賦活剤投与時の同組織の生体防御能に関する知見は乏しいため、本研究は学術上貢献するところが大きい。また、高濃度 AsA 投与時のヒラメ皮膚粘液のプロテオーム解析結果ならびに各種飼育環境下における *Hbβ* 遺伝子発現動態については、査読付きの原著論文として 2 編がすでに掲載されており、学術的意義もあると判断された。よって本論文は、博士 (生物資源科学) の学位を授与されるに値するものと認められる。

以上

令和 4 年 2 月 1 日